

基質アナログ結合型の結晶構造から解明されたセリンヒドロキシメチル基転移酵素の反応機構

Reaction mechanism of serine hydroxymethyltransferase revealed from a crystal structure of substrate-analogue binding form

湯川直樹¹, 生城浩子², 林 秀行², 後藤 勝³, 神谷信夫^{4,1}, 宮原郁子^{1,4}

¹大阪市大院・理, 〒558-8585 大阪市住吉区杉本 3-3-138

²大阪医大・医, 〒560-8686 高槻市大学町 2-7

³東邦大・理, 〒274-8510 船橋市三山 2-2-1

⁴大阪市大・複合先端研, 〒558-8585 大阪市住吉区杉本 3-3-138

1 はじめに

セリンヒドロキシメチル基転移酵素 (SHMT) は L-セリンをグリシンに変換すると同時に、テトラヒドロ葉酸 (THF) を 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸 (5,10-CH₂-THF) に変換する反応を触媒する。この反応は可逆的であり、生体内において 1 つの炭素基転移に関する代謝の中心的な役割を果たす。SHMT の活性は急速な細胞分裂中で最も高くなるということがこれまでに報告されており[1], また葉酸の代謝系は DNA の合成にも関与するため, SHMT に関する研究はがん医療におけるターゲットにもされている。SHMT はこの反応以外にもアルドール開裂, 脱炭酸, ラセミ化, アミノ基転移反応も触媒する。これまでに, 様々な種由来の SHMT の結晶構造解析が行われ[2-4], 構造情報が得られているが, 上記の反応に対するメカニズムは明らかになっていない。本研究では, この反応メカニズムを解明することを目的として, 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来 SHMT (*Tt*SHMT) の X 線結晶構造解析を行った。

2 実験

*Tt*SHMT の精製酵素で Native の結晶を得ることに成功した。この結晶を用いて, 基質アミノ酸と基質アナログである 5-メチルテトラヒドロ葉酸(5-MeTHF) を含む溶液にソーキングすることで, 酵素-基質三元複合体結晶を作製した。NW12A で回折実験を行ったところ, いずれの結晶も高い分解能でのデータを得て構造決定することが出来た。

表 1: 測定データの統計値

	Native	グリシン-5-MeTHF	L-セリン-5-MeTHF
Resolution (Å)	50.0 - 1.05 (1.07 - 1.05)	50.0 - 1.04 (1.06 - 1.04)	50.0 - 1.00 (1.02 - 1.00)
Completeness(%)	99.3 (99.8)	98.8 (96.9)	99.4 (98.7)
$\langle I \rangle / \sigma(I)$	47.3 (3.3)	35.7 (3.6)	45.5 (4.0)
R_{merge} (%)	4.8 (32.4)	6.0 (36.2)	4.7 (33.5)

()は最外殻を示す。

3 結果および考察

*Tt*SHMT の全体構造はホモダイマー構造であり, 結晶の非対称単位内にダイマーが存在していた。ソーキングした基質は 2 つの活性中心いずれも結合しており, さらに結合に伴い酵素の一部がわずかに閉じた構造をとることが分かった。

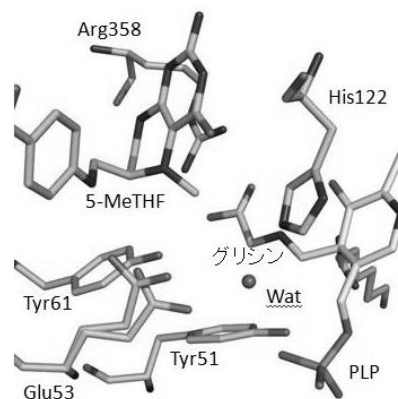


図 1. グリシン - 5-MeTHF 複合体の活性中心
基質が結合した活性中心では補酵素であるピリドキサル 5'-リン酸(PLP)がグリシンと Schiff 塩基結合を形成し, またその近傍に 5-MeTHF を明瞭に確認することができた。この構造から酵素と基質の詳細な結合様式が判明した。L-セリン - 5-MeTHF 複合体においてもほぼ同様の結合様式であった。

溶液ではグリシン - 5-MeTHF 複合体はキノノイド中間体を生成することが吸光スペクトルにより確認されており, L-セリンの場合には確認できないことが分かっていた。結晶構造でこれらの立体構造を明らかにすることができ, THF が L-セリンに対し求核攻撃を行うことから始まる直接置換による反応が有利であり, その場合触媒残基が, Glu53 である可能性が高いと推測できた。

4 まとめ

*Tt*SHMT の精製を確立し, 高分解能の測定結果が得られる結晶を多量に作製することに成功した。また基質複合体の構造, キノノイド中間体の形成から

SHMT の触媒反応機構を特定することができた。しかし、本研究の中で pH の変化により TtSHMT の機能が変化し、特に基質認識に対して違いが現れることが判明した。pH は酵素反応に対して大きな効果を与える。今後 SHMT の pH 変化における機能の変化についてさらに調べていく予定である。

参考文献

- [1] S.B.Renwick., *et al.*, *Structure* **6**, 1105 (1998).
- [2] J.N.Scarsdale., *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **296**, 155 (2000).
- [3] V. Trivedi., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **277**, 17168 (2002).
- [4] T.F. Fu., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **278**, 2645 (2002).

* miyahara@sci.osaka-cu.ac.jp